过热处理对人类食管癌细胞及中国仓鼠细胞DNA修补能力的抑制作用

陈去恶　周启玲　贾先礼　郑德存

（中国科学院生物物理研究所）

摘　要

人类食管癌细胞Eca—109在受8,000rad γ射线照射前，或照射后，用44°C处理30分钟，会全部抑制掉随后在37°C保温1.5小时内的DNA断链重接修补。照前42°C处理也能起部份的抑制作用；照后42°C处理的抑制程度与照前处理的相同，但似乎在42°C处理的时间内已完成了不受抑部份的修补。中国仓鼠细胞CHO-K1在紫外线照前受44°C处理30分钟，同样会全部地抑制掉照后37°C保温3小时内的DNA切除修补；照前用42°C处理，也有部份抑制作用。

一、引　言

用过热（hyperthermia）处理结合放疗或化疗，已认为是一种有希望的肿瘤疗法（李鼎九，1980；Silberner，1980），并已在临床试用中得到一些肯定的结果，目前国内外都在积极研究中。放疗和某些化疗药物都会损伤肿瘤细胞DNA，通常又认为DNA的损伤是肿瘤细胞受杀伤的主要原因之一。肿瘤细胞在射线照射后会对其受损伤的DNA进行修补，如果能使修补能力受到抑制，就有可能增高其死亡率，提高疗效。本研究的目的在于探讨过热处理对人类食管癌细胞和中国仓鼠细胞DNA修补能力的影响，了解过热处理增进疗效的可能机制，以供临床医师和实验治疗工作者参考。

二、材料与方法

（一）样品制备及照射

（1）用人类食管癌细胞Eca—109（中国医科院肿瘤研究所建株）为材料来检测过热处理对γ射线照后DNA断链重接修补的影响。样品制备及照射方法前已报导（陈去

本文1982年5月6日收到，1983年1月12日收到修改稿。

恶等），但使用前细胞培养时间为7天；样品细胞或悬于PBS中，或为模仿其原来生长环境而悬于"H—199"*培养基（含小牛血清20%）中，每ml含细胞2—13×10^5个；每组两支试管，样品量各为0.6ml。^{60}Co γ射线剂量率为967—1045rad/分，照射剂量为8,000 rad。

（2）用中国仓鼠细胞CHO—K1（中国科学院遗传所供株）为材料来检测过热处理对紫外线照后DNA切除修补的影响。细胞培养及照射方法前已报导（贾先礼等）。生长2天的细胞用PBS在原位上洗过，并吹打成悬液，每ml含细胞约1×10^5个，每样品取悬液2ml，在离心管中受过热处理，在敞开的60mm培养皿中受紫外线（2537埃）照射1.25分钟（经粗略计算约相当于50 J/m²）。

（二）过热处理 参考临床采用的过热范围(41—45°C)，我们选择42°C和44°C两种温度。将样品管插入超级恒温水浴中处理30分钟。检测DNA重接修补的实验有照前和照后处理两种方式，检测切除修补的只在照前处理。

（三）修补保温及修补能力测定

（1）食管癌细胞经过热处理、γ射线照射或照后过热处理，凡是要进行修补保温的各组，每管各加入H—199培养基2.5ml，放入37°C温箱保温1.5小时；不保温的各组不再加培养基，暂放于冰瓶中。检测DNA断链及重接能力的碱液洗脱法及荧光测定法前已介绍（陈去恶等），洗脱碱液的流过初速控制在0.5ml/分；荧光测定用414nm激发，在505nm接收；以微孔滤膜上剩留DNA量所占比例数的下降及回升来反映DNA的断链及重接情况。

（2）中国仓鼠细胞受过热处理和紫外线照射后，经离心去掉PBS，改悬于3ml含^{3}H—TdR（1μ Ci/ml）和羟脲(10m*M*)的199培养基（含小牛血清20%），移入培养瓶，在37°C温箱保温3小时(以上操作均在暗室中进行)，然后依照过去的方法（贾先礼等）制片和放射自显影。据我们过去的结果（贾先礼等），每核含6—60颗银粒的非分裂细胞比例数的大小，可作为CHO—K1细胞切除修补能力的指标，现在用同样的材料和相似的条件，仍以此为指标，每组观察非分裂细胞500个。

三、结　果

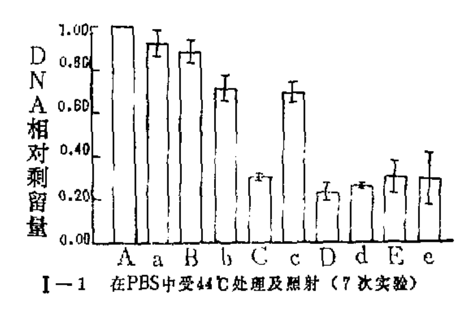
（一）过热处理对人类食管癌细胞DNA断链重接修补的抑制作用　图1表示细胞受过热处理及过热处理结合γ照射的实验结果**。经数理统计分析后根据组间显著性差异（$P<0.05$）描述如下：

（1）不受γ照射的各组　①细胞在过热处理的30分钟内会发生少量的DNA主链断裂：在H—199培养基中受44°C或42°C处理，或在PBS中受44°C处理，都出现此种情况。将图Ⅰ各系列实验（Ⅰ—1，Ⅰ—2，Ⅰ—3）的B与A组比较即可看出。②细

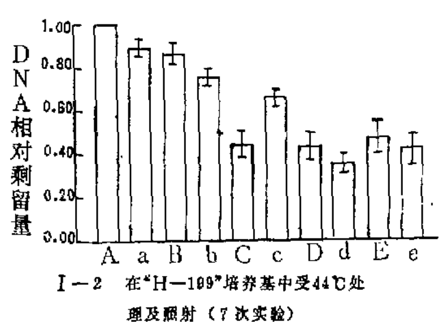
* 考虑到过热处理时普通199培养基中的CO_2可能跑失，变成碱性环境，对细胞不利，所以改用10m*M* HEPES为199培养基的pH缓冲剂（参看Shipman），我们称之为"H—199"培养基。

** 三系列实验是在约一年半内完成的，在此期间Eca—109细胞本身的DNA修补能力略有下降，但在我们的实验条件下所反映的规律还是一致的。CHO—K1细胞也有类似情况。

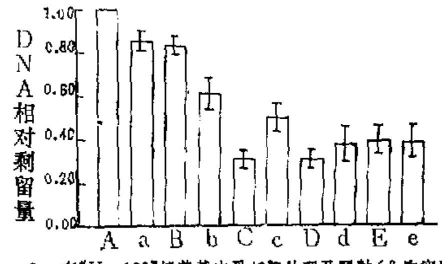
胞受过热处理后经37°C保温1.5小时，DNA断裂数进一步增多：可将图Ⅰ的各b与B组比较。　③不受过热处理的细胞在37°C保温1.5小时内，也有滤膜上DNA相对剩留量下降的表现：可将图Ⅰ的各a与A组比较（a及A组间的P值在图Ⅰ—1中等于0.05，在图Ⅰ—2和Ⅰ—3中都小于0.05）。



Ⅰ—1　在PBS中受44℃处理及照射（7次实验）



Ⅰ—2　在"H—199"培养基中受44℃处理及照射（7次实验）



Ⅰ—3　在"H—199"培养基中受42℃处理及照射（6次实验）

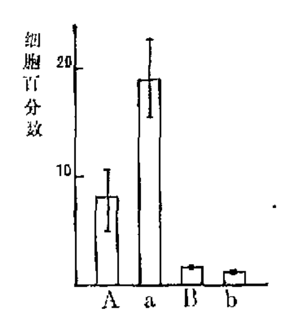
注：A．不过热处理，不照射，不保温
　　a．不过热处理，不照射，保温
　　B．过热处理，不照射，不保温
　　b．过热处理，不照射，保温
　　C．不过热处理，照射，不保温
　　c．不过热处理，照射，保温
　　D．过热处理，照射，不保温
　　d．过热处理，照射，保温
　　E．照射，过热处理，不保温
　　e．照射，过热处理，保温

图Ⅰ　过热处理对人类食管癌细胞DNA重接修补能力的抑制作用（照射剂量8,000 rad γ射线；过热处理30分钟；37°C修补保温时间1.5小时；以各A组的DNA剩留百分率作为1）

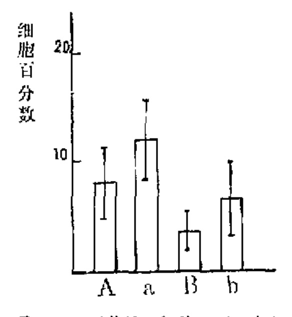
（2）受γ照射的各组*　①不受过热处理的受照细胞经修补保温后都表现出DNA断链重接的能力：可将图Ⅰ的各c与C组比较。　②照前受44°C处理的细胞经保温后见到DNA重接能力全部受抑制：可将图Ⅰ—1及Ⅰ—2的d与c组比较（并参看C组）。　③照后受44°C处理的细胞经保温后也见到重接能力全部受抑：可将图Ⅰ—1及Ⅰ—2的e与c组比较（并参看C及E组）。　④照前受42°C处理的细胞在保温后见到重接能力部份受抑，抑制部份约占可修补部份的60%：可将图Ⅰ—3的d与c组比较（并参看C及D组）。　⑤照后42°C处理的细胞经保温后所表现的重接能力与照前42°C处理的处在同一水平（图Ⅰ—3的e与d组比较），但它也与受同样照射和过热处理而不保温的E组相同，无法证明e组在保温中进行了重接修补。

* 这里所描述的是实际应用中要求了解的"总后果"，暂不考虑"扣除"单独受过热处理所造成的DNA断裂部份，因为目前还不知道过热处理在受照及不受照细胞中的效应机制是否相同。

（二）过热处理对CHO—K 1 细胞DNA切除修补的抑制作用* 经数理统计分析后根据组间显著性差异（$P<0.05$）描述于后：①不受过热处理的紫外线照射细胞，经37°C保温3小时后，都表现出对DNA进行切除修补的能力：由每核6—60标记银粒的细胞比例数的上升反映出来；可将图Ⅱ各a与A组比较。②不照射的细胞受42°C或44°C处理后，每核6—60银粒的细胞比例数下降（这可能是反映DNA复制合成的受抑）；可将图Ⅱ各B组与A组比较。③照前受44°C处理的细胞DNA切除修补能力全部受抑制掉：可将图Ⅱ—1的b与a组比较（并参看B组）。④照前受42°C处理对切除修补也有显著的抑制作用：可将图Ⅱ—2的b与a组比较。但没有全部抑制，因为b组的比例数高于同样受42°C处理而不受照射的B组。



Ⅱ—1 照前受44℃处理（5次实验）



Ⅱ—2 照前受42℃处理（6次实验）

（纵座标为每核出现6—60标记银粒细胞百分数）

图Ⅱ 过热处理对CHO—K1细胞DNA切除修补的抑制作用

（过热处理时间30分钟，紫外线照射1.25分钟约相当于50J/m²，各组都经37℃保温3小时）

注：A．不过热处理，不照射； a．不过热处理，照射；
B．过热处理，不照射； b．过热处理，照射。

四、讨 论

葛铭等曾以43.5°C处理Eca—109细胞2小时，然后照射500R，见到细胞生长能力全部受抑，而单独受43.5°C处理和单独受照500R的则在3天的生长延缓之后，又恢复迅速生长能力。我们以44°C照前或照后处理Eca—109细胞30分钟，见到细胞在随后保温的1.5小时内DNA重接能力全部受抑。这对于解释葛铭等的结果多少是有助的。照前42°C处理能部份地抑制食管癌细胞DNA重接能力，但照后处理的则保温与否的结果都一样（图Ⅰ—3 e及E组），也与照前处理照后保温的d组处在同一水平。我们推测这种细

---

* 我们虽然在修补保温的培养基中加入羟脲以抑制正常的DNA复制合成，但不照射的对照组仍有一定比例的6—60银粒的细胞。这是因为羟脲的抑制是有条件的，通常难于做到彻底，不同的羟脲浓度、不同细胞、细胞内及培养基中四种脱氧核苷酸的不同含量，都会影响抑制效果（参看 Timsor）。所以我们只能以实验组与对照组比例数的统计学差异来确定切除修补情况。

胞受照后能够在42°C处理中进行有限的重接修补。Ben-Hur 等也曾报导，中国仓鼠细胞V—79受5,800 rad照射后在42°C中能进行重接修补，且速度比在37°C中还快。

食管癌细胞单独受过热处理后及处理后再经保温，可以见到DNA断裂数逐步增多。这可能是由于溶酶体膜受过热损伤，部份水解酶漏出，作用于DNA的结果。

不受照射、不受过热处理的“正常” Eca—109 细胞，经1.5小时的37°C保温后，也见到滤膜上 DNA 相对剩留量的下降。推测可能原因有二：①有些原来处于G_1期末及S期的细胞，在保温时进行DNA复制合成，产生短段DNA(包括未接合的复制子和岗崎片段)，造成洗脱部份比例增高，因而滤膜上相对剩留量下降。②有些细胞在胰蛋白酶处理和吹散时已受损伤，在保温过程中可能发生少量细胞解体和DNA分子降解。

44°C照前处理能全部抑制CHO—K1 细胞保温 3 小时内的切除修补能力；42°C照前处理也有部份抑制作用。所表现的规律与食管癌细胞重接修补的受抑情况颇相似。

Clark和Lett曾提出，过热处理抑制CHO细胞的DNA重接修补是由于它使核内蛋白质—DNA结构发生异常，所根据的事实是：①细胞受42.5°C以上过热处理后，核内非组蛋白蛋白(nonhistone protein)量与 DNA 量的比例有“跳跃式”的增高。②将受45.5°C处理并受X照射的CHO 细胞与不受热处理而单受照射的细胞融合并保温后，只见到不受处理的细胞核 DNA 有重接修补，而受过热处理的则否，因而排除了由不受处理细胞质中的某些“修补因素”进入受处理细胞核内起作用的可能性。但我们认为同时也不能排除过热处理后核膜受损伤的可能后果。

附言：44°C照前或照后处理都会全部抑制掉人类食管癌细胞的DNA重接修补，这并不说明临床上照前及照后处理一定会有同等效果，因为我们的照后处理组样品从照后到处理之间是贮于冰瓶中（无法进行修补），这在病人身上是难于做到的。鉴于在正常的体温及生长环境中，细胞 DNA 一出现损伤就有可能立即进行修补，所以为取得更可靠的疗效，我们认为临床应用中将过热处理安排在临近放疗前进行较合适。

参 考 文 献

陈去恶　周启玲　1982　人类肝癌细胞的质膜额外损伤与辐射引起 DNA 断链的重接修补。生物化学与生物物理进展(1):37—40。

蒋　铭　章静波　张中兴　马用法　1980　高温与放射对人食管癌培养细胞和离体食管癌组织联合杀伤作用的研究。肿瘤研究（肿瘤高温治疗专辑）(2)：1—4。

贾先礼　郑德存　陈去恶　1982　分裂中期的CHO细胞能对其染色体DNA进行切除修补吗？动物学研究3(2)：123—126。

李鼎九　1980　肿瘤热疗的近况。肿瘤研究（肿瘤高温治疗专辑）(2)：53—57。

Ben-Hur, E., and Elkind, M. M. 1974 Thermally enhanced radioresponse of cultured Chinese hamster cells; damage and repair of single-stranded DNA and DNA complex. *Rad. Res.*, 59:484—495.

Clark, E. P., and Lett, J. T. 1978 Possible mechanisms for hyperthermic inactivation of the rejoining of X-ray-induced DNA strand breaks. in "Cancer therapy by hyperthermia" (ed. Streffer, C., et al.) pp. 144—145.

Lett, J. T., and Clark, E. P. 1978 Effects of hyperthermia on the rejoining of radiation-induced DNA breaks. in ibid., pp. 13—18.

Shipman, C., 1969 Evaluation of 4—(2—hydroxyethyl)—1—piperazinethane-sulfonic acid (HEPES)

as a tissue culture buffer. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 130:305—310.
Silberner, J. 1980 Hyperthermia hot stuff in cancer treatment-doctors are using heat to attack cancer cells. *Science News* 118(9):142.
Timsor, J. 1976 Hydroxyurea. *Mutation Res.*, 32:115—132.

INHIBITION OF DNA REPAIR ABILITY OF HUMAN ESOPHAGEAL CANCER CELL AND CHO-K1 CELL BY HYPERTHERMIA

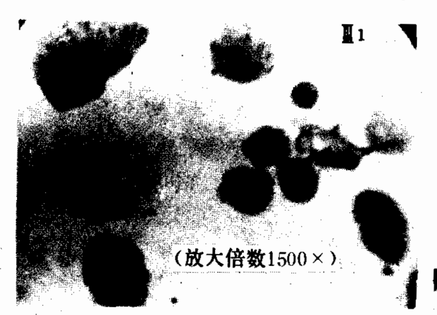
Chen Que Zhou Qilin Jia Xianli Zheng Decun
(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing, China)

Suspension samples of human esophageal cancer cell strain Eca-109 Were treated, before or after 8,000 rad ^{60}Co γ-irradiation, with 44° or 42°C for 30 minutes and then incubated in growth medium at 37°C for 1.5 hours. The 44° treatment inhibited the DNA rejoining repair completely. The 42° treatment inhibited it by about 60%, and the uninhibited portion could be repaired during the 42° treatment after irradiation. The suspension samples of CHO-K1 cell were treated, before UV-irradiation (about 50 J/M^2), with 44° or 42°C for 30 minutes and then incubated in growth medium containing ^{3}H-TdR (1μCi/ml) at 37°C for 3 hours. The 44° treatment inhibited the DNA excision repair completely. The 42° treatment inhibited it incompletely.

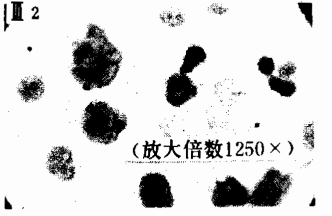
陈去恶等：过热处理对人类食管癌细胞及中国仓鼠细胞DNA修补能力的抑制作用

Chen Que et al.: Inhibition of DNA Repair Ability of Human Esophageal Cancer Cell and CHO-K1 Cell by Hyperthermia

图Ⅲ：中国仓鼠细胞CHO-K1在含^{3}H-TdR（1μci/ml）的199培养基中37℃保温3小时的标记情况及过热处理对DNA切除修补的抑制效果。



Ⅲ-1：在正常条件下保温后出现核内含大量银粒的细胞（约占10.5%），表示DNA正常复制合成中^{3}H-TdR的掺入。



Ⅲ-2：在含有羟脲（10mM）及^{3}H-TdR的199培养基中保温后，未见核内含大量银粒的细胞，只见到每核含6-60颗银粒的细胞，约占8%，表示DNA正常复制合成已大部受羟脲抑制掉。

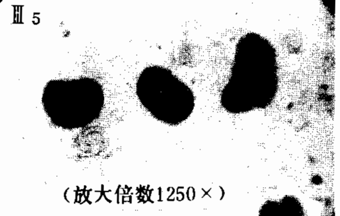
Ⅲ3

（放大倍数1250×）

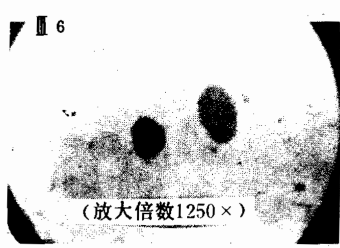
Ⅲ-3：保温条件同Ⅲ-2，而在保温前受紫外线照射1.25分钟，未见每核含大量银粒的细胞，但每核含6-60颗银粒的细胞增多，平均约占15%。表现出DNA切除修补。



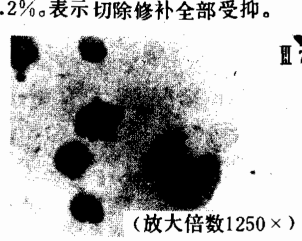
Ⅲ-4：保温条件同Ⅲ-2，但保温前受44℃处理30分钟。未见核内含大量银粒的细胞。每核含6-60颗银粒的细胞只占约1.6%，表示复制合成受过热进一步抑制。



Ⅲ-5：保温及44℃处理条件同Ⅲ-4，但在过热处理后受紫外线照射1.25分钟，然后保温。未见核内含大量银粒的细胞；每核含6—60颗银粒的细胞只占1.2%。表示切除修补全部受抑。



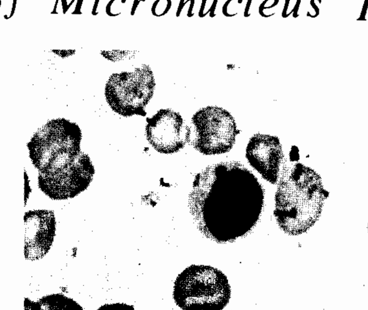
Ⅲ-6：过热处理温度改用42℃，其余条件同Ⅲ-4。未见核内含大量银粒的细胞，每核含6—60颗银粒的细胞约占3.8%，仍可反映DNA正常复制受过热进一步抑制。



Ⅲ-7：过热处理温度改用42℃，其余条件同Ⅲ-5。未见核内含大量银粒的细胞，每核含6—60颗银粒的细胞约占6.6%，表示切除修补受抑不完全。

薛开先等：人体末梢血微核测试法的研究

Xue Kaixian et al.: A study of Micronucleus Test by Human Skin Puncture



照片1 人体手指血淋巴细胞微核。照片示一个主核和一个微核。（×1000）